

黄琦,廖鑫,吴芹,等. 金钗石斛总生物碱对糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠胰岛素抵抗的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 75-78, 98.

Huang Q, Liao X, Wu Q, et al. Effects of *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids on insulin resistance in diabetic rats with non-alcoholic fatty liver disease [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 75-78, 98.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.08.012

金钗石斛总生物碱对糖尿病合并非酒精性 脂肪肝大鼠胰岛素抵抗的影响

黄琦¹, 廖鑫², 吴芹³, 王攀¹, 石京山^{3*}

(1.遵义医学院附属医院核医学科, 贵州 遵义 563000; 2.遵义医学院附属医院内分泌科, 贵州 遵义 563000; 3.遵义医学院基础药理教育部重点实验室, 贵州 遵义 563000)

【摘要】 目的 研究金钗石斛总生物碱(*Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids, DNLA)对糖尿病合并非酒精性脂肪肝(NAFLD)大鼠胰岛素抵抗的影响。**方法** 高脂高糖饲料喂养SD大鼠4周后给予腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ) 40 mg/kg 制备糖尿病合并NAFLD大鼠模型。成模大鼠随机分为模型组、DNLA 20 mg/kg组、DNLA 40 mg/kg组、DNLA 80 mg/kg组及二甲双胍100 mg/kg组, 每组10只。同步设立10只SD大鼠作为空白对照。灌胃给药4周后腹主动脉取血检测大鼠空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(FINS)水平, 计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR), H.E.染色观察肝脏及胰腺组织形态学变化, 免疫组化检测胰岛中胰岛素达。**结果** 模型大鼠FPG、FINS、HOMA-IR明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, DNLA 40 mg/kg组、DNLA 80 mg/kg组FPG、FINS、HOMA-IR明显下降($P < 0.05$)。糖尿病大鼠肝脏组织发生脂肪变性, 胰腺组织H.E.染色镜下见胰岛萎缩, 岛内细胞数减少; DNLA 40 mg/kg组、DNLA 80 mg/kg组与模型组比较, 肝脏脂肪变性程度减轻, 胰岛内细胞数较多, 免疫组化检测糖尿病合并NAFLD大鼠胰岛内胰岛素表达明显减少, 与模型组比较, DNLA 40 mg/kg组、DNLA 80 mg/kg组胰岛内胰岛素表达有不同程度增加。**结论** DNLA可降低糖尿病合并NAFLD大鼠血糖及减轻肝脏脂肪变性, 机制与改善胰岛素抵抗有关。

【关键词】 金钗石斛; 生物碱; 链脲佐菌素; 非酒精性脂肪肝; 糖尿病; 胰岛素抵抗; 大鼠
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 08-0075-04

Effects of *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids on insulin resistance in diabetic rats with non-alcoholic fatty liver disease

HUANG Qi¹, LIAO Xin², WU Qin³, WANG Pan¹, SHI Jingshan^{3*}

(1. Department of Nuclear Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, 563000, China.
2. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, 563000.
3. Key Laboratory of Basic Pharmacology, Ministry of Education, Zunyi Medical University, Zunyi, 563000)

【Abstract】 Objective To study the effects of *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids (DNLA) on insulin resistance in diabetic rats with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Sprague-Dawley (SD) rats were fed a high-fat, high-sugar diet for 4 weeks, and intraperitoneally injected with 40 mg/kg streptozotocin to establish a diabetic rat model with NAFLD. Rats were then randomly divided into the model group, DNLA 20 mg/kg group, DNLA 40 mg/kg group,

[基金项目] 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字LKZ[2012]32号)。
[作者简介] 黄琦,男,副教授,硕士,从事内分泌、核医学基础与临床研究。E-mail: huangqi001@sina.com
[通信作者] 石京山,男,教授,博导,研究方向:内分泌药理学、神经药理学。E-mail: shijs@zmc.edu.cn

DNLA 80 mg/kg group, and metformin 100 mg/kg group ($n = 10$ rats per group). Ten normal SD rats were used as controls. Four weeks after intragastric administration of the drugs, fasting blood glucose (FPG) and fasting insulin (FINS) levels were measured, the insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated, histological changes of the liver and pancreas were observed using hematoxylin and eosin staining, and islet insulin levels were detected by immunohistochemistry. **Results** FPG, FINS, and HOMA-IR were significantly increased in the model rats compared with controls ($P < 0.05$), and FPG, FINS, and HOMA-IR were significantly decreased in the DNLA 40 mg/kg and DNLA 80 mg/kg groups compared with controls ($P < 0.05$). Compared with the model group, the degree of fatty degeneration of the liver and the number of islet cells were reduced in diabetic rats. The expression of insulin in the islets of diabetic rats with NAFLD was significantly decreased. Compared with the model group, DNLA 40 mg/kg and DNLA 80 mg/kg groups showed a reduced extent of fatty degeneration of the liver and more islet cells. Insulin expression increased by varying degrees in the islets of the 40 mg/kg and 80 mg/kg DNLA groups. **Conclusions** DNLA reduces blood glucose and liver steatosis in diabetic rats with NAFLD. The mechanism may be related to the improvement of insulin resistance.

【**Keywords**】 *Dendrobium nobile* Lindl.; alkaloids; streptozotocin; non-alcoholic fatty liver disease; diabetes mellitus; insulin resistance; rats

糖尿病是常见的代谢性疾病之一,往往与其他代谢性疾病并存,例如肥胖、非酒精性脂肪肝、高脂血症等。胰岛素抵抗和或胰岛素分泌不足是糖尿病的主要病理生理特征,而胰岛素抵抗、肥胖、血脂紊乱及脂肪肝构成代谢综合征的中心环节。化学药物中对代谢综合征进行干预的药物较少,而传统中药对于改善血糖的优势虽不如化学药物那样直接和效果显著,但其对代谢综合征多种组成疾病的干预有其优势。本课题组前期初步研究发现金钗石斛总生物碱(*Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids, DNLA)对实验性糖尿病动物模型有保护作用^[1,2]。DNLA可降低 db/db 小鼠血糖,其机制与改善胰岛素抵抗有关^[3]。本题拟进一步探讨 DNLA 对以糖尿病、非酒精性脂肪肝(NAFLD)为主要组份的代谢综合征的干预作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,6 周龄,体质量 200~220 g,由陆军军医大学大坪医院实验动物中心提供[SCXK-军 2014-005]。实验在遵义医学院教育部基础药理重点实验室进行[SYXK(黔) 2014-003]。伦理审查编号:伦审[2017] 2-016 号。本实验操作遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

金钗石斛产于贵州省赤水市石斛种植基地, DNLA 由贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室提取,总碱含量 > 98%;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自美国 Sigma 公司;盐酸二甲双胍片,由中美上海施贵宝制药有限公司生产;

大鼠超敏胰岛素放免试剂盒,购自美国 LINCO 公司。苏木精、伊红,为北京赛驰生物科技有限公司产品,多聚赖氨酸、胰岛素抗体及相关免疫组化试剂,购自中国武汉博士德生物工程有限公司。奥林巴斯 AU2700 型自动生化分析仪(日本 Olympus 公司),放免计数器 Ger-2010(GAMBYT-CR 型,中国科大创新股份有限公司中佳分公司),尼康光学显微镜(Nikon 仪器有限公司),低温离心机(centrifuge 5417R,德国 Eppendorf 公司),强生稳步倍加型血糖仪及血糖试纸(强生医疗器材有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型的制备

SD 大鼠 62 只,适应性喂养 1 周,然后给予高脂高糖饲料连续喂养 4 周,在禁食 8 h 后给予 STZ (40 mg/kg)腹腔注射一次,3 d 后每日剪尾取血测定空腹血糖,筛选出空腹血糖连续 3 d ≥ 11.1 mmol/L 者为实验用模型大鼠^[4-5],成模大鼠共 60 只,2 只大鼠于造模后第 3 天因血糖过高死亡。

1.3.2 实验分组及给药

选取雄性 SD 大鼠 10 只设为空白组。模型大鼠按血糖、体质量随机分组为:模型组、DNLA 低剂量组、DNLA 中剂量组、DNLA 高剂量组、二甲双胍组,每组 10 只。各组大鼠均每日灌胃 1 次,连续 4 周,模型组及空白组给予等体积的双蒸水灌胃,给药组给予相应药物灌胃。

1.3.3 标本采集及检测

各组大鼠连续灌胃 4 周,禁食 8 h 麻醉生效后行腹主动脉取血,应用低温离心机分离血清待测。空腹血糖(FPG)应用全自动生化分析仪检测,空腹胰岛素(FINS)使用大鼠超敏胰岛素试剂盒,采用放

射免疫法进行检测。根据测得的 FPG 及 FINS 结果,按公式计算出各组大鼠的胰岛素抵抗指数 HOMA-IR ($HOMA-IR = FPG \times FINS/22.5$)^[6]。麻醉取血后处死大鼠,取出肝脏及胰腺组织,用 4% 中性甲醛固定 48 h,进行石蜡包埋后制备组织切片,进行苏木素-伊红染色,常规脱水、封片后显微镜下观察组织形态、结构。同时采用免疫组化法检测胰岛中胰岛素的表达。

1.4 统计学方法

实验数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 19.0 软件包进行单因素方差分析,两两比较使用 LSD-*t* 法,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 DNLA 对糖尿病合并 NAFLD 大鼠 FPG、FINS、HOMA-IR 的影响

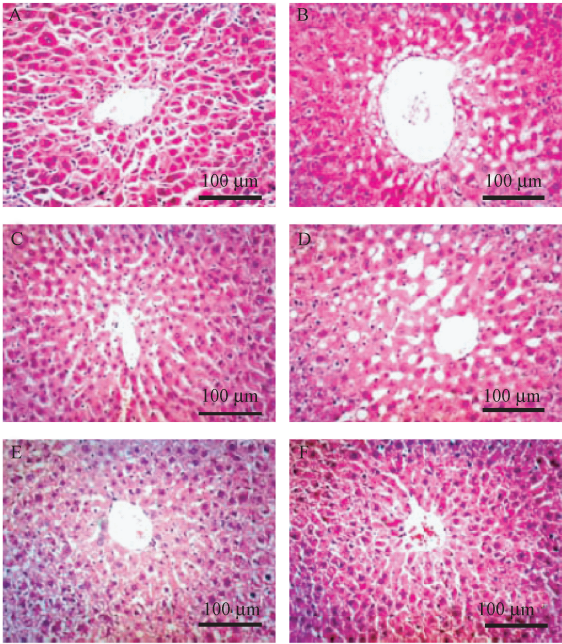
模型组大鼠 FPG、FINS、HOMA-IR 明显高于空白组 ($P < 0.05$);与模型组比较, DNLA 中剂量、DNLA 高剂量组及二甲双胍组大鼠 FPG、FINS、HOMA-IR 明显下降 ($P < 0.05$),见表 1。

2.2 DNLA 对糖尿病合并 NAFLD 大鼠肝脏组织形态的影响

空白组大鼠肝内肝小叶结构清楚,肝细胞形态结构正常,模型组大鼠肝小叶内肝细胞索排列紊乱,肝细胞内出现空泡状脂肪变性,肝细胞核被脂滴推向一侧,形态酷似脂肪细胞。二甲双胍组大鼠肝脏脂肪变性程度明显较模型组减轻。DNLA 40、80 mg/kg 不同程度的减轻糖尿病合并 NAFLD 大鼠肝脏脂肪变性,见图 1。

2.3 DNLA 对糖尿病合并 NAFLD 大鼠胰岛组织形态及胰岛素表达的影响

大鼠胰腺组织病理切片进行 HE 染色后显微镜下观察,空白组大鼠胰岛呈椭圆形,边界清晰,岛内



注:A:空白组;B:模型组;C:二甲双胍组;D:DNLA 低剂量组;E:DNLA 中剂量组;F:DNLA 高剂量组。

图 1 DNLA 对糖尿病合并 NAFLD 大鼠肝脏组织形态学的影响(HE 染色)
Note. A, blank group. B, model group. C, metformin group. D, DNLA low-dose group. E, DNLA medium-dose group. F, DNLA high-dose group.

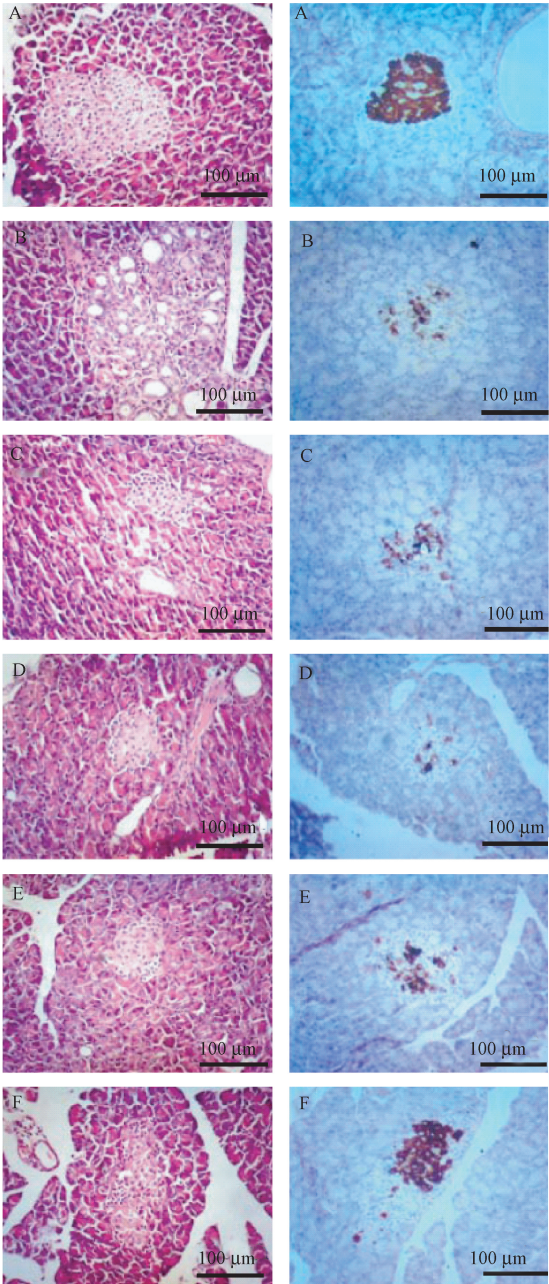
Figure 1 Effects of DNLA on liver histology in the diabetic rats with NAFLD. HE staining.

细胞数均较多;模型组大鼠胰岛萎缩,形状结构不规则,岛内细胞数减少,出现部分空泡化结构;二甲双胍组与空白组大鼠相比较,胰岛内细胞数减少;DNLA 中、高剂量组与模型组比较,胰岛内细胞数较多,见图 2(左列)。免疫组化染色后镜下观察到模型大鼠胰岛数目较空白组减少,与 HE 染色结果相一致,同时可见胰岛中胰岛素表达明显减少;与模型组比较, DNLA 中、高剂量组胰岛内胰岛素表达有不同程度增加,见图 2(右列)。

表 1 DNLA 对糖尿病合并 NAFLD 大鼠 FPG、FINS、HOMA-IR 的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)
Table 1 Effects of DNLA on FPG, FINS, HOMA-IR in the diabetic rats with NAFLD

组别 Groups	剂量 Doses	空腹血糖 FPG (mmol/L)	空腹胰岛素 FINS (pg/L)	胰岛素抵抗指数 HOMA-IR
空白 Blank	—	4.42±0.63	40.5±6.3	0.25±0.06
模型 Model	—	27.12±3.95*	57.9±6.9*	1.59±0.27*
二甲双胍 Metformin	100 mg/kg	9.25±3.21#	44.8±5.9#	0.42±0.14#
DNLA 低剂量 DNLA low dose	20 mg/kg	22.87±6.75	54.1±8.6	1.38±0.59
DNLA 中剂量 DNLA medium dose	40 mg/kg	23.21±5.49#	43.8±8.1#	0.45±0.21#
DNLA 高剂量 DNLA high dose	80 mg/kg	12.28±4.25#	41.5±7.9#	0.44±0.19#

注:.,与空白组比较,* $P < 0.05$ 。与模型组比较,# $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the blank group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$.



注:A:空白组;B:模型组;C:二甲双胍组;D:DNLA 低剂量组;E:DNLA 中剂量组;F:DNLA 高剂量组;左列:HE, ×400;右列:免疫组化 IHC, ×400。

图 2 DNLA 对糖尿病合并 NAFLD 大鼠胰腺组织形态学及胰岛内胰岛素表达的影响

Note. A, blank group. B, model group. C, metformin group. D, DNLA low dose group. E, DNLA medium dose group. F, DNLA high dose group. Left column: HE staining. Right column: immunohistochemical Staining.

Figure 2 Effects of DNLA on pancreatic histology and INS expression in the diabetic rats with NAFLD

3 讨论

代谢综合征是机体发生的一种以蛋白质、脂

肪、碳水化合物等物质代谢紊乱的病理生理状态,是一组十分复杂的代谢紊乱症候群,其组份包括高血糖、血脂紊乱、超重或肥胖、高血压等,其基本特征是胰岛素抵抗。本研究探讨了 DNLA 对糖尿病合并 NAFLD 大鼠模型的胰岛素抵抗的影响,该模型同时具有高血糖、血脂代谢紊乱、非酒精性脂肪肝,这与文献报道相符合^[7-10],动物模型成熟且能反应代谢综合征的特点。

目前化学药物对代谢综合征的治疗主要是针对各自的疾病进行不同的用药,仅有少数药物可同时发挥多重作用,例如二甲双胍在降血糖的同时可改善血脂代谢紊乱及脂肪肝^[11-12],这在本研究中也同样观察到这一结果。

中药的多靶点作用在改善胰岛素抵抗、保护胰岛 β 细胞、调节血脂、减轻脂肪肝方面具有潜在优势。石斛属 *Dendrobium* Sw. 是兰科重要的属之一。石斛作为中药材,已被广泛使用达千年。近几十年来,国内外学者从石斛属植物的药用部位中分离鉴定出多种化合物,包括生物碱、多糖、黄酮等类化合物。石斛在缓解糖尿病及其并发症、抑制肿瘤、抗氧化、抗炎等方面的有一定药理作用^[13-14]。多项研究证实石斛有明显的降血糖作用,且对胰岛功能有保护作用^[15-16],而石斛的特征性成分是生物碱。

本课题组采用不同糖尿病动物模型研究了贵州赤水产金钗石斛生物碱对血脂代谢的影响,不仅局限于其降糖作用的研究,更强调对整体模型动物代谢紊乱的干预,前期已发现 DNLA 能降低糖尿病模型鼠血糖、血脂,本研究进一步证实了其降糖作用,同时观察到 DNLA 改善了糖尿病合并 NAFLD 大鼠的胰岛素抵抗,减轻代谢综合征在肝脏及胰岛的病理进展,保护胰岛 β 细胞功能,改善模型大鼠的代谢紊乱综合征。DNLA 改善胰岛素抵抗的机制,本课题组前期应用 db/db 小鼠研究已发现可能与上调端粒酶活性、端粒酶逆转录酶、TERC mRNA 表达,增加 POT1、TFR2 蛋白表达水平、下调 TRF1 蛋白表达有关^[3]。

综上所述, DNLA 可改善糖尿病合并 NAFLD 大鼠高血糖、肝脏脂肪变性,其机制与其改善胰岛素抵抗有关,详细的其他分子机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] 黄琦,李菲,吴芹,等. 金钗石斛总生物碱对四氧嘧啶所致糖尿病大鼠的保护作用 [J]. 遵义医学院学报, 2009, 32(5): 451-453. (下转第 98 页)